

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESSENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 06 JUN 2001

WIRB PCT



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT1126-019	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00637	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/01/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 13/02/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12		
Anmelder OSTEOGENETICS GMBH		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 31/08/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 01.06.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Heckl, K Tel. Nr. +49 89 2399 8430 

I. Grundlag des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-32 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-26 eingegangen am 30/06/2000 mit Schreiben vom 29/06/2000

Zeichnungen, Blätter:

1-10 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

33-37, eingereicht mit dem Antrag.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 1,2,4-9,11-26.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 1,2,4-9,11-26 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	3part,10 part
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	3part,10part
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	3part,10part
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

Zu Punkt I

Grundlage des Bescheides

sind die Ansprüche 1-26, eingereicht mit Schreiben vom 29.06.00. Die Ansprüche genügen den Anforderungen von Art.34(2)(b) PCT.

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Wie im Internationalen Recherchenbericht festgestellt, wurde der Gegenstand der Ansprüche 3 und 13 (nunmehr Ansprüche 3 und 10) einer Recherche unterworfen - soweit eine Stütze durch die Beschreibung vorliegt. Diese Stütze sind nach Auffassung der IPEA die Beispiele 1 und 2, also eine BMP-2 Variante mit inserierter Sequenz SEQ.ID.NO 3 zwischen Aminosäuren 8 (Gln) und 9 (Arg) eines humanen Met-Ala-BMP-2, bzw. eine BMP-2 Variante mit inserierter Sequenz SEQ.ID.NO 4 zwischen Aminosäuren 8 (Gln) und 9 (Arg) eines humanen BMP-2. Andere, unter den Bereich der Ansprüche 3 und 10 fallende konkrete Ausführungsformen sind diesen Beispielen nicht zu entnehmen.

Dies bedeutet, daß sich die internationale vorläufige Prüfung auf die Ansprüche 3 und 10 beziehen kann, mit der Maßgabe, daß es sich bei dem "Polypeptid" (siehe Anspruch 1) um Met-Ala-BMP-2 bzw um BMP-2 handelt und die Insertion zwischen Aminosäuren 8 und 9 erfolgt.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Die folgenden Dokumente werden in die Internationale vorläufige Prüfung aufgenommen:

D1: RUPPERT R. ET AL.: 'Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity' EUR. J. BIOCHEM., Bd.

237, 1996, Seiten 295-302, XP000891887 in der Anmeldung erwähnt

D2: WO 97 47312 A (COMMW BIOTECHNOLOGIES INC) 18. Dezember 1997
(1997-12-18)

D3: FROMM J.R. ET AL.: 'Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor.' ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Bd. 323, Nr. 2, 10. November 1995 (1995-11-10), Seiten 279-287, XP000891918

D4: ALBERDI E. ET AL.: 'Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site' BIOCHEMISTRY, Bd. 37, 1998, Seiten 10643-10652, XP002135602

D5: EP-A-0 414 915 (SUNTORY LTD ;INOUE MASAYASU (JP)) 6. März 1991
(1991-03-06)

Der genannte Stand der Technik

D1 beschreibt eine Heparin-Bindungsstelle im N-terminalen Bereich von hBMP-2. Gleichzeitig wird eine hBMP-2 Variante beschrieben, die keine Bindung an Heparin, jedoch eine erhöhte spezifische Aktivität aufweist (siehe D1, Introduction, letzter Absatz, Diskussion, die letzten drei Absätze).

D2 beschreibt synthetische Heparin-Antagonisten, die nicht die Heparin-Bindungssequenzen der vorliegenden Anmeldung (SEQ.ID.NO.3 und 4) verwenden, und deren Verwendung zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen (siehe D2, Seite 6, Zeilen 1-11 und Ansprüche 1-21).

D3 diskutiert die Bedeutung von Arginin und Lysin in der Bindung von Heparin an aFGF. Die darin genannten Bindungsdomänen unterscheiden sich ebenfalls von SEQ.ID.NO.3 und 4 der vorliegenden Anmeldung (siehe D3, Zusammenfassung und Tabelle 1).

D4 diskutiert die Heparin-Bindungsstelle von PEDF. Die darin genannten Bindungsdomänen unterscheiden sich ebenfalls von SEQ.ID.NO.3 und 4 der vorliegenden Anmeldung (siehe D4, Zusammenfassung und Abb.8).

D5 beschreibt eine SOD mit einer zusätzlichen Heparin-Bindungsstelle. Die genannten Bindungsdomänen unterscheiden sich ebenfalls von SEQ.ID.NO.3 und 4 der vorliegenden Anmeldung (siehe D5, Ansprüche 1-3)

Neuheit und Erfinderische Tätigkeit (Art.33(2) und (3) PCT):

Der Gegenstand der Ansprüche 3 und 10 (soweit der IPE unterworfen) ist neu. Bezüglich der erfinderischen Tätigkeit kann D1 als nächster Stand der Technik angesehen werden. Wie bereits festgestellt, diskutiert D1 die Rolle von Heparin in der Aktivität von h BMP-2 (siehe Diskussion), läßt aber den Schluß nicht zu, daß eine Einführung einer zusätzlichen Heparinbindungsstelle zu einer Erhöhung der biologischen Aktivität führt. Somit ist dem oben genannten Gegenstand ein erfinderischer Beitrag zuzusprechen.

30 JUNE 2000

Patentansprüche

1. Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit, **dadurch gekennzeichnet, daß**

- (i) an die Aminosäuresequenz eines Polypeptides wenigstens ein Oligopeptid, umfassend die Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, addiert ist; und/oder
- (ii) in die Aminosäuresequenz eines Polypeptides wenigstens ein Oligopeptid, umfassend die Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, inseriert ist, und/oder
- (iii) wenigstens eine natürlicherweise in der Aminosäuresequenz eines Polypeptids vorkommende Oligopeptidsequenz durch ein Oligopeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, substituiert ist,

wobei

X_1 =K, R oder H;
 X_2 =K, R oder H;
 X_3 =K, R, H oder keine Aminosäure;
 X_4 =kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;
 X_5 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure;
 X_6 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure (SEQ ID NO:1)

oder

X_1 =K, R oder H;
 X_2 =kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;
 X_3 =K, R oder H;
 X_4 =kein K, R, H, sonst beliebige Aminosäure;
 X_5 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure;
 X_6 =kein K, R, H, sonst beliebige oder keine Aminosäure (SEQ ID NO:2)

bedeutet und

das Polypeptid aus Mitgliedern der DVR-Familie einschließlich der TGF- β Superfamilie ausgewählt ist.

2. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein bis vier Kopien des Oligopeptides an ein bis vier Positionen in das Polypeptid eingefügt sind.
3. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligopeptid die Aminosäuresequenz RKRA (SEQ ID NO:3) oder RKRAKHKQ (SEQ ID NO:4) umfaßt.
4. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligopeptid an den N-Terminus addiert ist und/oder in den N-terminalen Bereich inseriert ist und/oder einen Teil des N-terminalen Bereiches substituiert.
- (5. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aminosäuresequenz der Polypeptidvariante ferner eine für die rekombinante Expression relevante Sequenz am N-Terminus umfaßt, wobei die für die rekombinante Expression relevante Sequenz M oder MZ ist und wobei M Methionin und Z eine oder mehrere beliebige Aminosäuren bedeutet.
6. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polypeptidvariante ferner ein His-Tag umfaßt.
- (7. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid durch Addition, Substitution, Insertion, Inversion und/oder Deletion verändert ist, wobei das durch Addition, Substitution, Insertion, Inversion und/oder Deletion veränderte Polypeptid wenigstens 10 % der biologischen Aktivität des unveränderten Polypeptides aufweist und/oder mindestens 50 % homolog dazu ist.
8. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 - 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7/OP-1 oder BMP-8/OP-2 ist.
9. Polypeptidvariante einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligopeptid vor dem Cystinknoten eingefügt ist.

10. Polypeptidvariante gemäß Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polypeptidvariante die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 5 (T3) oder SEQ ID NO:6 (T4) hat.
11. Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polypeptidvariante ein Poly-, Oligo- oder Dimer der Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 ist.
12. Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für eine Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 kodierende Nukleinsäuresequenz.
13. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäuresequenz von einer genomischen DNA oder cDNA abgeleitet oder eine synthetische DNA ist.
14. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 12 oder 13, weiterhin umfassend einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für eine Polypeptidvariante kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht.
15. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei das Nukleinsäuremolekül wenigstens einen Teil eines Vektors enthält.
16. Wirtszelle, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei die Wirtszelle eine zur Expression des Nukleinsäuremoleküls geeignete prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.
17. Verfahren zum Herstellen einer Polypeptidvariante mit erhöhter Heparin-Bindungsfähigkeit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, umfassend das Addieren wenigstens eines Oligopeptides, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2, an die Aminosäuresequenz eines Polypeptides; und/oder das Inserieren wenigstens eines Oligopeptides, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2, in die Aminosäuresequenz eines Polypeptides; und/oder das Substituieren wenigstens einer natürlicherweise in der Aminosäuresequenz eines

30 JUNE 2000

Polypeptids vorkommenden Oligopeptidsequenz durch ein Oligopeptid, das eine Aminosäuresequenz enthält, die ausgewählt ist aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren ein chemisches und/oder enzymatisches Syntheseverfahren umfaßt.
19. Verfahren gemäß Anspruch 17 oder 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren gentechnologische Verfahren umfaßt.
20. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren umfaßt:
- a) *in vitro* Mutagenese einer für ein Polypeptid kodierenden Nukleinsäure, so daß (i) an die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure wenigstens eine Nukleinsäure addiert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID Nos. 1 und 2, enthält; und/oder (ii) in die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäure wenigstens eine Nukleinsäure inseriert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID Nos. 1 und 2, enthält; und/oder (iii) wenigstens eine natürlicherweise in der für das Polypeptid kodierenden Nukleinsäure vorkommende Nukleinsäuresequenz durch eine Nukleinsäuresequenz substituiert wird, die für ein Oligopeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus: SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2, enthält;
 - b) Einklonieren der mutierten Nukleinsäure in einen geeigneten Expressionsvektor;
 - c) Transformieren/Transfizieren einer geeigneten Wirtszelle mit dem erhaltenen Expressionsvektor;
 - d) Kultivieren der transformierten/transfizierten Wirtszelle unter zur Expression geeigneten Bedingungen;
 - e) Isolieren und gegebenenfalls Renaturieren der exprimierten Polypeptidvariante.
21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren in einer prokaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise *E. coli*, durchgeführt wird.
22. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verfahren in einer eukaryontischen Zelle, bevorzugt einer Hefe-, Pflanzen-, In-

30 JUNE 2000

sekten-, CHO- oder COS-Zelle, durchgeführt wird.

23. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 und gegebenenfalls physiologisch verträgliche Zusatzstoffe.
24. Verwendung einer Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Stimulierung der Osteogenese oder Wundheilung, oder zur Behandlung von Entzündung oder Krebs.
25. Zusammensetzung zur Osteoinduktion, umfassend eine Polypeptidvariante gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 und einen Träger, ausgewählt aus Heparin, Hydroxylapatit, Hyaluronsäure, synthetischen Polymeren und Collagen.
26. Osteoinduktive Matrix, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Heparin oder Heparin-ähnliche Substanzen enthält oder damit beschichtet ist und an das Heparin oder die Heparin-ähnlichen Substanzen Polypeptidvarianten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 adsorbiert sind.